



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA



ANDRESSA RODRIGUES DE FREITAS

**USO DA FIBRA DE CANA DE AÇÚCAR NA ALIMENTAÇÃO
E SEU EFEITO NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA DAS VIAS
AÉREAS**

DIADEMA

2018

ANDRESSA RODRIGUES DE FREITAS

**USO DA FIBRA DE CANA DE AÇÚCAR NA ALIMENTAÇÃO
E SEU EFEITO NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA DAS VIAS
AÉREAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Farmácia, ao Instituto de Ciências
Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas da Universidade
Federal de São Paulo – Campus
Diadema.

Orientação: Professora Doutora
Caroline Marcantonio Ferreira

DIADEMA

2018

FREITAS, Andressa Rodrigues

Uso da fibra de cana de açúcar na alimentação e seu efeito na inflamação alérgica das vias aéreas/ Andressa Rodrigues de Freitas, Diadema, 2018

49f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)
Universidade Federal de São Paulo- Campus Diadema, 2018

Orientadora: Caroline Marcantonio Ferreira

1. Asma. 2. Fibras dietéticas. 3. Microbiota intestinal.

CDD 616.97

ANDRESSA RODRIGUES DE FREITAS

USO DA FIBRA DE CANA DE AÇÚCAR NA ALIMENTAÇÃO E SEU EFEITO NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA DAS VIAS AÉREAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Aprovado em: 19/11/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Caroline Marcantonio Ferreira (UNIFESP)

Profa. Dra. Patrícia Xander Batista (UNIFESP)

Profa. Dra. Aline A. Cavalari Corete (UNIFESP)

Dedico este trabalho a Deus por ter sido meu apoio nesta longa jornada. À minha família e amigos de laboratório, por toda compreensão e suporte. À Professora Doutora Caroline Ferreira, por toda paciência e incentivo para realização e conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de estar onde estou, pela vida, pelo ar que respiro. Por ter permitido tudo isto.

À Universidade Federal de São Paulo por ser minha segunda casa, pelos conhecimentos transmitidos e pelas amizades formadas.

Aos meus Professores, por todo conhecimento transmitido, fazendo com que me torne um ser humano melhor.

Profa Dra Caroline M. Ferreira, pela paciência e apoio na execução deste trabalho.

À Fapesp 2012/50410-8, projeto Jovem Pesquisador da Profa Dra Caroline M. Ferreira pelo financiamento deste trabalho.

À minha família por todo amor, compreensão e suporte em todas as áreas. Reconheço que sem vocês eu não seria o que sou e nem estaria onde estou.

Ao Henrique Pereira, por toda compreensão, por ser meu ombro amigo, conselheiro e por todo suporte durante todos esses anos. Sem você seria muito mais difícil.

Ao grupo MIAVA pela recepção, ajuda, não somente no âmbito científico, mas pessoal também. Este trabalho não teria sido construído sem a ajuda de vocês.

Aos meus amigos por terem respeitado e entendido meus períodos de reclusão e por todo apoio e momentos que temos passado juntos.

RESUMO

Asma é uma doença crônica das vias aéreas, caracterizada principalmente por hiperreatividade brônquica, produção exacerbada de muco e eosinofilia. Nos países ocidentais observa-se um aumento nos casos de asma, isso se deve as mudanças nos hábitos dietéticos, consumo de alimentos com poucas fibras. Algumas fibras dietéticas podem modular a microbiota intestinal e o sistema imunológico. Sabendo-se também que é importante aproveitar alimentos que estão sendo desperdiçados e que podem ser potencialmente importantes para saúde, esse trabalho objetiva avaliar o potencial terapêutico das fibras que compõem o bagaço de cana-de-açúcar na asma alérgica experimental. Portanto, os animais foram alimentados com ração AIN93M com substituição de 6% de amido de milho por fibras do bagaço da cana, enquanto que os animais controle se alimentaram apenas com ração AIN93M. Todos os animais, exceto os não alérgicos, foram sensibilizados via intraperitoneal com ovalbumina (OVA) e hidróxido de alumínio. Os desafios foram realizados via intratraqueal apenas com OVA e PBS. A inflamação foi avaliada através do lavado broncoalveolar (LBA) quanto a presença de eosinófilos e neutrófilos, também foi avaliado a inflamação no tecido pulmonar através da peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase neutrofílica (MPO). Ao analisar o lavado broncoalveolar, os animais alérgicos que se alimentaram com a fibra da cana apresentaram melhora na inflamação com diminuição no número de leucócitos. Porém, não observamos diferença estatística para a peroxidase eosinofílica e neutrofílica. Logo, pode-se concluir que as fibras encontradas no bagaço da cana foram capazes de diminuir o infiltrado inflamatório nos pulmões.

Palavras chave: Asma. Fibras dietéticas. Microbiota intestinal.

ABSTRACT

Asthma is a chronic disease of the airways, characterized mainly by bronchial hyperreactivity, exacerbated mucus production and eosinophilia. In Western countries there is an increase in cases of asthma, this is due to changes in dietary habits, consumption of foods with few fibers. Some dietary fibers can modulate the intestinal microbiota and the immune system. It is also known that it is important to take advantage of foods that are being wasted and that may be potentially important for health. This work aims to evaluate the therapeutic potential of sugarcane bagasse fibers in experimental allergic asthma. Therefore, the animals were fed AIN93M feed with 6% substitution of corn starch by sugarcane bagasse fibers, whereas the control animals fed only AIN93M feed. All animals, except non-allergic animals, were sensitized intraperitoneally with ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide. The challenges were performed intratracheally only with OVA and PBS. Inflammation was evaluated through bronchoalveolar lavage (BAL) for the presence of eosinophils and neutrophils, and inflammation in lung tissue was evaluated through eosinophil peroxidase (EPO) and neutrophil myeloperoxidase (MPO). When analyzing bronchoalveolar lavage, the allergic animals that fed on sugarcane fiber showed improvement in inflammation with a decrease in the number of leukocytes. However, we did not observe statistical difference for eosinophilic and neutrophilic peroxidase. Therefore, it can be concluded that the fibers found in sugarcane bagasse were able to decrease the inflammatory infiltrate in the lungs.

Keywords: Asthma. Dietary Fiber. Gut Microbiota.

LISTA DE DEFINIÇÕES

Prebiótico: geralmente definidos como "ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e / ou atividade de um ou de um número limitado de espécies bacterianas já estabelecidas no cólon e, assim, efetivamente melhorar a saúde do hospedeiro" (GIBSON; ROBERFROID, 1995 apud FAO; WHO, 2006 p. 18).

Probiótico: são bactérias que desempenham efeitos benéficos em humanos e animais. Uma de suas funções seria a restauração da microbiota intestinal saudável (FAO; WHO, 2006 p. 2).

Microbiota intestinal: conjunto de microrganismos presentes no intestino que auxiliam no processo de digestão e controle do desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Vivem comensalmente, trazendo benefícios para a saúde do hospedeiro (VIEIRA et al., 2016)

Eosinófilo: são granulócitos presentes na circulação que possuem enzimas intracelulares que são lesivas aos parasitas. Estão presentes em tecidos periféricos e podem aumentar em número em condições inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012 p. 19).

Neutrófilo: são células polimorfonucleares mais abundantes na circulação sanguínea. Fazem parte das fases iniciais de reações inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012 p. 16).

Mononucleares: consistem em células cuja função é a fagocitose, sendo a principal célula o macrófago. Desempenham funções importantes na imunidade inata (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012 p. 17).

Th2: são células T CD4+ virgens que se diferenciaram devido a citocinas presentes no início das respostas imunes, que levam a ativação da transcrição e modificação epigenética (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012 p. 215).

Citocinas: são grupos de moléculas que tem como principal função emissão de sinais químicos para desencadear respostas imunes.

Melena: presença de sangue nas fezes.

Celulose: principal polissacarídeo estrutural das plantas; componente mais abundante da parede celular, é constituído de monômeros de glicose ligados entre si (DICIONÁRIO ONLINE DE PORTUGUÊS, 2018).

Hemicelulose: polissacarídeos que compõem a parede celular de vegetais.

Pectina: homopolissacarídeo coloidal e hidrossolúvel presente nas paredes celulares do tecido vegetal (DICIONÁRIO ONLINE DE PORTUGUÊS, 2018).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Asma e microbiota intestinal.....	11
1.2. Influência de uma dieta rica em fibras	14
1.3. Fibras do bagaço da cana de açúcar	18
1.4. Cana de açúcar na saúde e na doença.....	21
1.4.1 Queimada da cana e doenças respiratórias	21
1.4.2 Fibras da cana e doenças	22
2. OBJETIVO GERAL.....	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Animais.....	23
3.2. Administração da dieta rica em fibras da cana de açúcar	23
3.3. Extração das fibras do bagaço da cana de açúcar.....	24
3.4. Modelo de asma experimental	25
3.5. Lavado broncoalveolar	25
3.6. Peroxidase eosinofílica.....	26
3.7. Mieloperoxidase neutrofílica.....	26
3.8. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Análise do bem estar animal	27
4. 2. Análise do consumo de ração e ganho de peso.....	28
4. 3. Análise de inflamação pulmonar	30
4.4. Análise de peroxidase eosinofílica e mieloperoxidase neutrofílica.....	34
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

APÊNDICE A – Certificado de aprovação de projeto	46
APÊNDICE B – Receita da ração AIN93M.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Asma e microbiota intestinal

Asma é uma doença crônica das vias aéreas, caracterizada principalmente por contração exagerada da musculatura lisa dos brônquios (hiperreatividade brônquica, HRB), produção exacerbada de muco e eosinofilia (COHN; ELIAS; JACHUPP, 2004). A asma acomete, aproximadamente, 300 milhões de pessoas no mundo (MASOLI et al., 2004) e estima-se que em 2025, mais de 100 milhões de pessoas serão afetadas por esta patologia (MASOLI et al., 2004). O tratamento da asma é complexo, sendo sua efetividade dependente de fatores ambientais e genéticos (OBER; VERCELLI, 2011). Atualmente, baseia-se principalmente em terapias anti-inflamatórias, as quais não curam a asma (CRIMI et al., 2011), pois apenas possuem a função de melhorar os sintomas. Além disso, a hiperreatividade das vias aéreas podem persistir mesmo na ausência da inflamação (CRIMI et al., 2011), pois notou-se que há fatores externos como atividade física, exposição ocupacional a substâncias químicas e mudanças climáticas, por exemplo, que demonstram a hiperreatividade como sintoma (NIH, 2014).

Segundo o DATASUS, no Brasil cerca de 6,4 milhões de pessoas são asmáticas e aproximadamente, 20% das crianças em idade escolar têm asma, mas a doença não está controlada. Com isto, o Brasil faz parte do grupo de países que possuem a maior prevalência de asmáticos no mundo. O número de internações por asma no Brasil, é de cerca de 120.000. As regiões norte e nordeste a cada 100.000 habitantes, apresentaram alta taxa de hospitalizações quando comparados a outras regiões do Brasil, mas a região sudeste apresentou alta taxa de mortalidade hospitalar. Em todas as regiões, a média de tempo de hospitalização é de três dias. Porém, isto acarreta altos gastos ao nosso Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2010, eram gastos em média, cerca de 162,78 USD (dólares norte-americanos) que somando, chegavam a 170 milhões de USD por ano (CARDOSO et al., 2017).

Apesar de ser um tanto quanto raro, o número de óbitos por asma no Brasil diminuiu cerca de 10% nos últimos anos, mas ainda é um número alto (BRASIL, 2018), (VENTURA, 2018). Isto acontece, pois muitas vezes a doença não está devidamente controlada e, principalmente, o paciente ter um quadro severo de asma, em que,

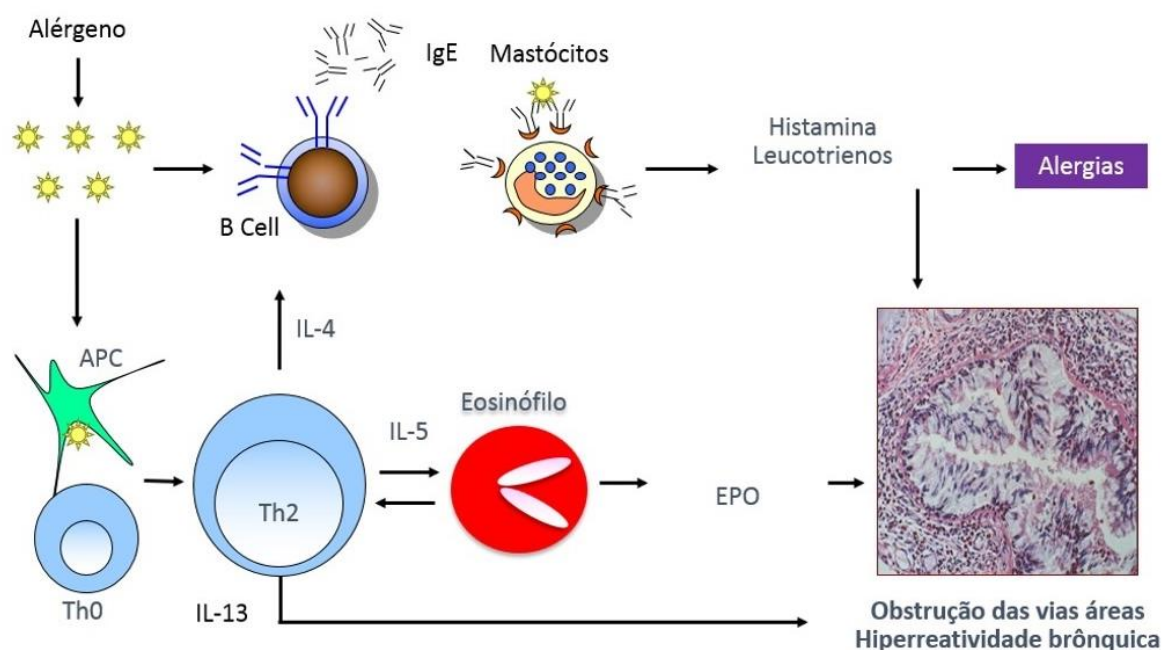
quando há crise, ocorre uma demora para o tratamento. Existem casos também que devido à gravidade da doença, o paciente necessita de associação de medicamentos como, corticoides e omalizumabe, por exemplo, mas por fatores como, burocracia e devido ao custo, levando ao baixo alcance por populações carentes, acabam não obtendo efetividade do tratamento, muitas vezes levando ao agravamento da doença e até mesmo o óbito (VENTURA, 2018).

Assim como o Brasil, nos países ocidentais observa-se aumento nos casos de asma, de 25 a 75% a cada década, desde 1960 (WILLS-KARP; SANTELIZ; KARP, 2001). Este fato se deve, em grande parte, a mudanças no estilo de vida da população, tais como: excesso de higiene ou pouca exposição a micróbios, uso de antibióticos e dieta com poucas fibras e rica em gordura (VERCELLI, 2010) (ALLAN; DEVEREUX, 2011) (FERREIRA et al., 2014). Em estudos epidemiológicos foi mostrado que a exposição a micróbios durante os primeiros anos de vida, parece ser um fator crítico para as doenças alérgicas, podendo ser benéfica para um melhor desenvolvimento. Essas observações originaram a hipótese da higiene (VON MUTIUS; VERCELLI, 2010). Resumidamente, essa teoria propõe que o excesso de limpeza e menor contato com patógenos, levaria a estimulação insuficiente do sistema imunológico. Complementando esta teoria, o uso de antibióticos na vida precoce também está associado com sensibilização alérgica e hiperreatividade brônquica (FANARO et al., 2003). Em conjunto, estes dados são sugestivos que a exposição aos micróbios poderia modular o sistema imunológico. Da mesma maneira, a microbiota intestinal, nossa maior exposição a esses microrganismos, modularia os processos fisiopatológicos da asma. Mais do que isso, fatores que modulem ou alterem a microbiota intestinal podem alterar o sistema imunológico e favorecer o desenvolvimento de doenças.

Crianças não asmáticas possuem uma microbiota intestinal diferente de crianças com asma, podendo ser observada uma variedade maior de bactérias. As crianças asmáticas possuem em sua microbiota intestinal, alta prevalência de algumas espécies de *Clostridia difficile* (bactéria com características patogênicas) e baixa de *Bifidobactéria* (bactérias não patogênicas) (BOTTCHEER et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que crianças com maior diversidade de microbiota intestinal possuem menor chance de desenvolver asma (ABRAHAMSSON et al., 2014) (FERREIRA et al., 2014). Já foi mostrado que camundongos Germ-free, portanto sem

microbiota intestinal, exibem uma resposta Th2 exagerada nas vias aéreas e hiperreatividade brônquica aumentada (HERBST et al., 2011), indicando que não só a composição da microbiota, mas também sua presença são fatores importantes para o controle da inflamação e função pulmonar.

Figura 1: Como ocorre a inflamação do tipo Th2. Ao entrar em contato com o alérgeno, as células apresentadoras de antígeno o capturam e o apresentam para um linfócito Th0, ou seja, um linfócito que não foi previamente sensibilizado. Após a sensibilização pela célula apresentadora de antígeno e estímulo pela citocina IL4, o linfócito Th0 passa a ser Th2, liberando citocinas como IL4, IL5 e IL13. A citocina IL4 estimula os linfócitos B a produzirem anticorpos do tipo IgE, que por sua vez, se ligam a receptores Fc presentes na membrana de mastócitos, sensibilizando-os. Ao entrar novamente em contato com o alérgeno, os mastócitos liberam seus grânulos contendo histamina e leucotrienos, levando aos sintomas alérgicos e obstrução das vias aéreas. A citocina IL5 estimula os eosinófilos, que contêm enzimas intracelulares que são tóxicas (como a peroxidase eosinofílica). Ao liberarem estas enzimas, os eosinófilos causam obstrução das vias aéreas. A citocina IL13 é a citocina que estimula as células caliciformes a produzirem muco, e a produção exacerbada de muco causa obstrução das vias aéreas e hiper-reatividade brônquica.



Fonte: imagem cedida pela Profa Dra Caroline M. Ferreira

Vários fatores interferem para a composição da microbiota, dentre os quais podemos citar: (a) tipo de parto (natural versus cesárea) (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010, BIASUCCI et al., 2010, EL AIDY et al., 2010) , (b) dieta (leite materno versus fórmula; dieta rica em fibras ou em gordura) (FANARO et al., 2003, FERNANDEZ et al., 2013, DE FILIPPO et al., 2010, GIGANTE et al., 2011) e (c) uso precoce de antibióticos (ORTQVIST et al., 2014, RUSSELL et al., 2012). O tipo de dieta alimentar tem sido um dos fatores mais importantes na modulação da microbiota intestinal e consequentemente do sistema imunológico (TROMPETTE et al., 2014) (VIEIRA; FUKUMORI; FERREIRA, 2016). Observou-se que uma dieta rica em fibras pode melhorar doenças alérgicas.

1.2. Influência de uma dieta rica em fibras

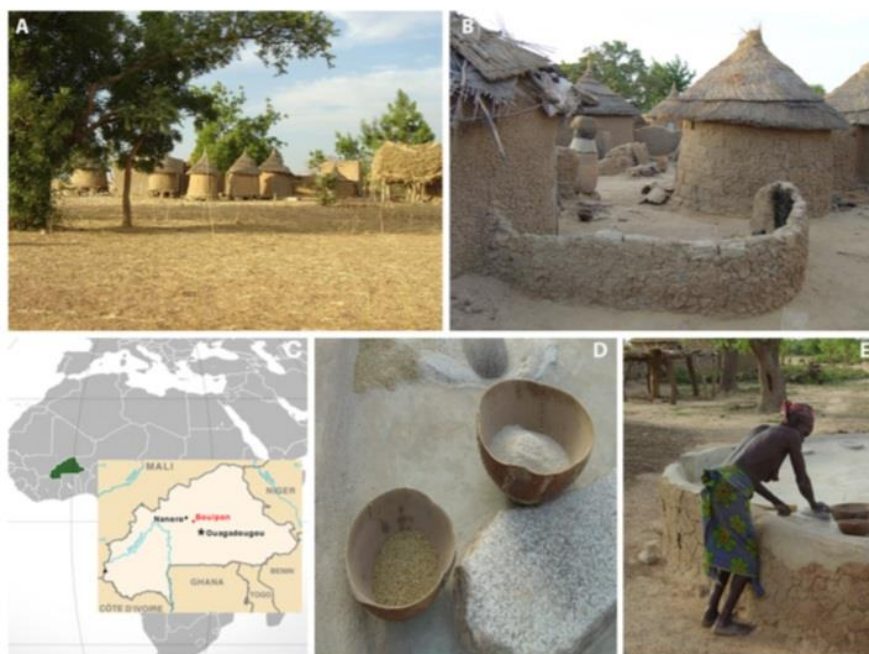
A *American Association of Cereal Chemists* (1999) propôs como fibra alimentar, a porção de plantas ou carboidratos que tem como característica a resistência em serem digeridos e absorvidos pelo intestino delgado (principal local de absorção e fermentação de fibras alimentares), sendo fermentados total ou parcialmente. As fibras alimentares correspondem por celulose, hemicelulose, lignina, pectina, psyllium, glucanas e gomas, por exemplo. Estas fibras são encontradas principalmente na parede de células vegetais, conferindo proteção, uma vez que formam uma camada muito resistente.

Logo, as fibras foram classificadas segundo a sua solubilidade em água:

- Fibras solúveis → dissolvem-se na água, formando uma substância gelatinosa. Por conta desta propriedade de formação de substância gelatinosa, são utilizadas pela indústria alimentícia para alterar viscosidade de alimentos. (MIRA; GRAF; CANDIDO, 2009). Compreendem fibras solúveis à pectina, psyllium e algumas hemiceluloses.
- Fibras insolúveis → são pouco ou não fermentadas pelo intestino logo, diminuem o trânsito intestinal, formando um volume fecal maior, pois retém água. São fibras insolúveis à celulose, hemicelulose e lignina (MIRA; GRAF; CANDIDO, 2009).

Baseado nas particularidades de como cada fibra interage em nosso organismo, um estudo demonstrou o impacto da dieta na composição da microbiota intestinal. Este estudo mostrou que a microbiota de crianças que vivem na Burkina Faso, uma região pouco industrializada e muito agrária da África, apresentam uma microbiota intestinal diferente de crianças europeias, mais especificamente da Itália (DE FILIPPO et al., 2010).

Figura 2: Vida rural em Burkina Faso. (A) Vila de Boulpon. (B) Moradias comuns da região. (C) Mapa de Burkina Faso. (D) Milho e sorgo (componentes básicos da dieta). (E) Milho e sorgo sendo moídos para gerarem uma espécie de mingau chamado Tô.



Fonte: DE FILIPPO; DI PAOLA; RAMAZZOTTI, et al. 2010

As crianças de Burkina apresentam maior quantidade de bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes, enquanto as crianças da Europa possuem maior quantidade de bactérias do filo Firmicutes, quando comparadas com as crianças da Burkina.

Além disso, foi observado que as crianças da Burkina apresentavam grande quantidade de ácido graxo de cadeia curta nas fezes (DE FILIPPO et al., 2010), esses ácidos graxos entram em contato com células imunológicas que possuem receptores para os mesmos (GPR41 e GPR43) levando ao desenvolvimento de uma resposta

imunoregulatória ou anti-inflamatória. Isso explicaria o porquê que crianças da Burkina raramente desenvolvem alergia ou asma e na Europa há uma alto índice de asma (OBER, 2016) (FELLOWS et al., 2018).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são provenientes da fermentação de fibras pela microbiota intestinal, principalmente por bactérias do Filo Bacteroidetes (FELLOWS et al., 2018). Animais deficientes de GPR43, um receptor acoplado a proteína G-43 que liga-se aos AGCC, importante receptor de acetato, apresentam uma resposta exacerbada da inflamação nos modelos de colite, artrite e asma (TROMPETTE et al., 2014, DUNCAN et al., 2007, DE VADDER et al., 2014, DAVID et al., 2014). Os AGCC de forma geral, são importantes para o recrutamento e quimiotaxia de células para sítios inflamatórios, além de modularem a produção de mediadores inflamatórios. Além dos AGCC outros mecanismos podem estar envolvidos na relação entre fibras dietéticas e microbiota intestinal.

Zhang et al., (2016) em seu estudo demonstrou que o uso da fibra pectina na alimentação possui o potencial de diminuir os sintomas alérgicos como, coceira nasal e espirros. Além de exibir um potencial protetor contra alergias, através da regulação de uma resposta Th1 e Th2. Uma dieta rica em pectina também foi capaz de inibir significativamente a expressão de citocinas como IL4 e aumentou a expressão de IL10 e diminui os níveis séricos de IgE (ZHANG et al., 2016).

A obesidade é uma comorbidade que gradativamente vem crescendo, assim como a asma, no Brasil e no mundo (BBC, 2018) e isto se deve ao fato da mudança alimentar da população. Sabe-se que uma mudança na alimentação interfere na composição de nossa microbiota intestinal, e tanto na obesidade quanto na asma, a composição variada da microbiota desempenha variados mecanismos de proteção ou pode ser até mesmo prejudicial (SOKOLOWSKA et al., 2018). Indivíduos obesos possuem cerca 92,6% de filo Firmicutes e Bacteroidetes, mas com maior prevalência de Firmicutes (SOKOLOWSKA et al., 2018). Bactérias Firmicutes demonstraram serem capazes de quebrar carboidratos indigeríveis, transformando-os em fonte absorvível de energia, fazendo com que haja um aumento no ganho de peso (SOKOLOWSKA et al., 2018, KRAJMALNIK-BROWN et al., 2012, WOLF; LORENZ, 2012).

Logo, faz-se necessária a utilização de fibras solúveis, ou seja, que podem ser facilmente digeridas e fermentadas por nossa microbiota intestinal, uma vez que

retardam a absorção de carboidratos pelo organismo. Em um estudo de Jenkins et al., (2002) onde foi realizada a suplementação com polissacarídeos β -glucanos, provenientes da aveia, na alimentação de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, observou-se diminuição do índice glicêmico dos alimentos e, conseqüentemente, da glicose no sangue destes pacientes (JEKINS et al., 2002). Esta capacidade de diminuir o índice glicêmico dos alimentos se deve ao fato da facilidade que o β -glucano tem em influenciar na atividade de enzimas e bactérias intestinais (SARGAUTIENE; NAKURTE; NIKOLAJEVA, 2018). Então, sabe-se que estes pacientes apresentam diminuição do risco de doenças coronarianas, além de conseguirem manter os níveis de glicose no sangue controlados, obtendo assim, o controle da diabetes.

Com isto, nota-se que o uso de fibras, assim como na asma, demonstrou melhorar a obesidade. Isto porque a microbiota intestinal de camundongos alimentados com ração hiperlipídica com adição de cerca de 10% de fibras como a celulose, psyllium e fibra da cana, apresentaram melhora na sensibilidade a insulina e melhora nos níveis de glicose sanguínea. Além disto, apresentaram modulação da expressão gênica de grelina e um aumento da concentração de GLP-1, porém, não se sabe quais os mecanismos envolvidos (WANG et al., 2007).

A resposta ao tratamento convencional para asma, com corticoesteroides ou broncodilatadores, se mostrou difícil em pacientes obesos, pois os medicamentos utilizados atualmente foram desenvolvidos seguindo o modelo de asmáticos magros, logo, o tratamento será mais efetivo nesses pacientes, sendo este um dos motivos pelo qual os obesos não respondem tão bem ao tratamento (PRADEEPAN; GARRISON; DIXON, 2013). Com isto, percebe-se a necessidade de medidas alternativas para redução dos sintomas da asma nestes pacientes. Como já foi exposto anteriormente, o uso de fibras pode melhorar a asma e concomitantemente, a obesidade (WANG et al., 2007, MIAO et al., 2016).

Avaliando um produto largamente produzido no Brasil, muito descartado e rico em fibras que podem auxiliar na resposta a doenças, estudamos o bagaço da cana de açúcar.

1.3. Fibras do bagaço da cana de açúcar

O bagaço proveniente da moagem da cana de açúcar, é um dos maiores resíduos da agroindústria brasileira (NOVA CANA, 2018). E mesmo sendo reaproveitado, grande parte do bagaço da cana continua sendo largamente descartado.

Figura 3: Produtos obtidos a partir da cana e açúcar e de seu bagaço.

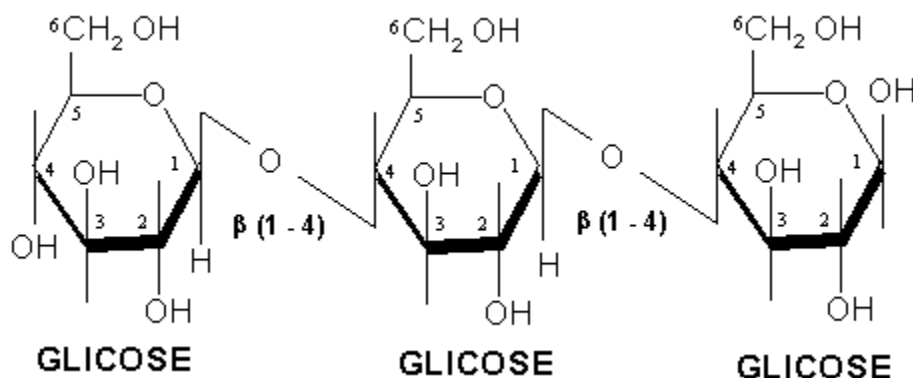


Fonte: Próprio autor.

Cerca de 47% do bagaço da cana de açúcar, é constituído por celulose, 8,9% de hemicelulose e cerca de 34,3% constituído por ligninas totais (GOUVEIA et al., 2009). São encontradas principalmente na parede de células vegetais.

A celulose é uma fibra insolúvel composta por moléculas de D-glucose unidas por ligações β -glicosídicas que são unidas através de pontes de hidrogênio. É uma molécula não ramificada. Estas ligações β -glicosídicas são ligações do tipo covalentes, o que acaba garante a sua característica insolúvel e a dificuldade de degradação das mesmas (SANTOS et al., 2012) (Figura 4).

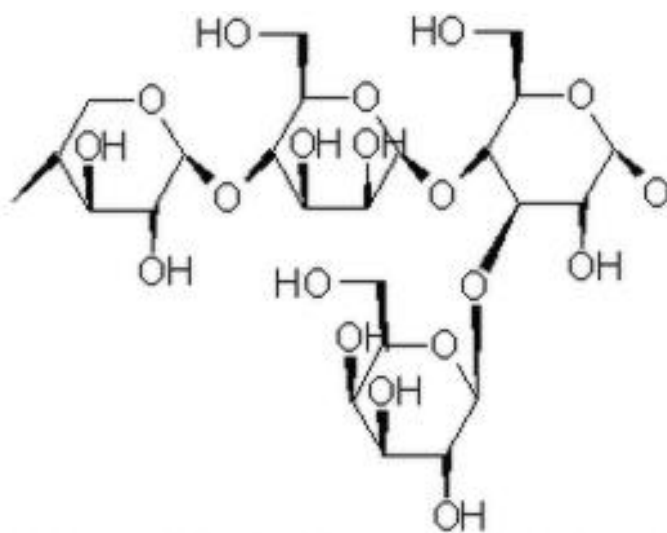
Figura 4: Molécula de celulose. D-glucose unidas por ligações β -glicosídicas.



Fonte: Disponível em: < <http://carboidratosfarmfametro.blogspot.com/2013/05/boa-noite-esta-semana-iremos-falar.html>>. Acesso em: 22/11/2018

A hemicelulose possui a característica de ser uma molécula com cadeia ramificada composta por heteropolissacarídeos complexos D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico (SANTOS et al., 2012) (Figura 5).

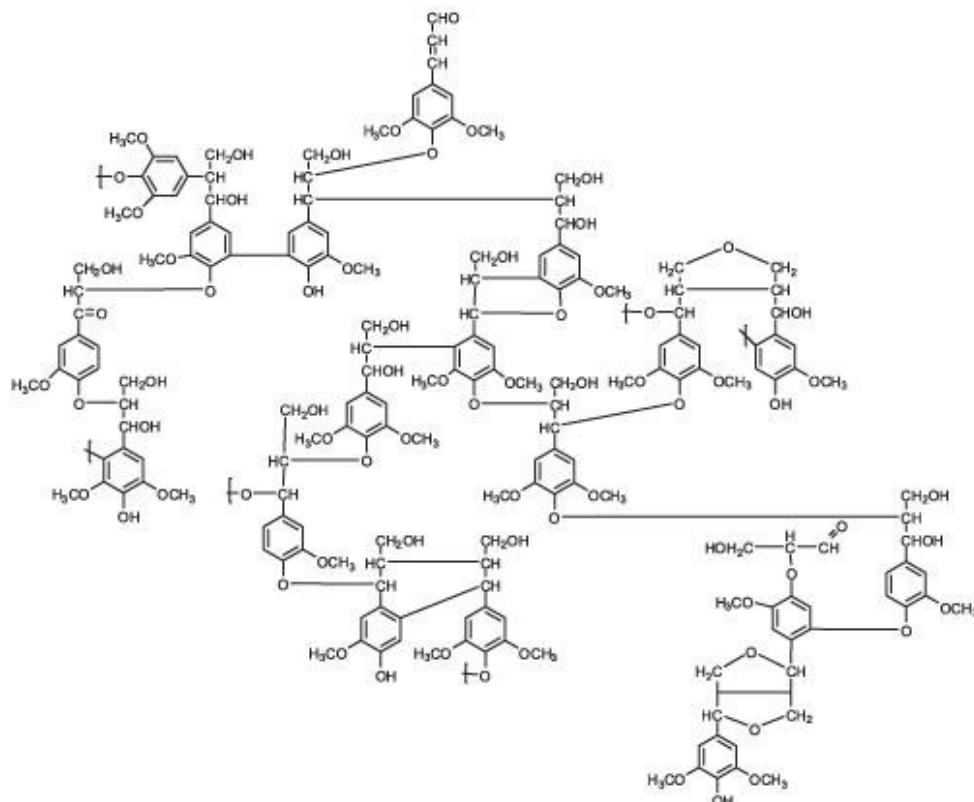
Figura 5: Molécula de hemicelulose. Possui cadeia ramificada composta por heteropolissacarídeos complexos.



Fonte: Disponível em: < <https://pt.esdifferent.com/difference-between-cellulose-and-hemicellulose>>. Acesso em: 22/11/2018

A molécula de lignina consiste de três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico. Porém, a composição e organização da lignina varia de acordo com a espécie de planta estudada (SANTOS et al., 2012) (Figura 6).

Figura 6: Molécula de lignina. Esta molécula possui estrutura complexa, variável segundo a espécie e é hidrofóbica.



Fonte: SANTOS, Fernando A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. Química Nova, 2012. v. 35. n. 5. 1004 p.

Estas fibras, sendo solúveis ou insolúveis já apresentaram potencial de modulação de mecanismos de doenças como obesidade e asma, por exemplo. Por isto, podem ser utilizadas, através da alimentação, como uma terapia coadjuvante, melhorando assim a sintomatologia destas doenças. Principalmente por estarem em grande parte dos alimentos, aumentando assim, o seu alcance.

1.4. Cana de açúcar na saúde e na doença

1.4.1 Queimada da cana e doenças respiratórias

O bagaço da cana é uma matéria prima não tão estudada e utilizada pela indústria alimentícia, e com isto, acabam sendo descartadas algumas toneladas de bagaço da cana. O descarte pode ser realizado através da queima. Porém, muitas vezes, a queimada ocorre pré colheita com o intuito de melhorar o seu corte pelas máquinas ou trabalhadores, pois com a queimada, retira-se a palha da cana e folhas secas, restando apenas o seu caule (RIBEIRO; ASSUNÇÃO, 2002) (Figura 4).

Figura 7: Cana de açúcar pré (A) e pós (B) queimada.



Fonte: (A) Disponível em:<<http://www.sifaeg.com.br/xtimeline/inovacao-plantio-da-cana-de-acucar/>>. Acesso em: 06/11/18 (editada)

(B) Disponível em:< <https://melacos.com.br/noticias/em-municipio-paulista-palha-da-cana-so-podera-ser-queimada-com-autorizacao>>. Acesso em: 06/11/2018 (editada)

Com a queimada da cana, observa-se prejuízos ao meio ambiente como alterações climáticas devido a emissão de gases poluentes no ar (RIBEIRO; ASSUNÇÃO, 2002), observa-se que há um aumento na frequência de sintomas de doenças alérgicas como espirro, coriza e obstrução nasal e consequentemente, aumenta-se a incidência de internações principalmente de crianças e idosos durante os períodos de queima (RIGUEIRA; ANDRÉ; ZANETTA, 2011, RIBEIRO, 2008). Isto acaba por aumentar os gastos públicos com internações durante estes períodos (CARDOSO et al., 2017, VENTURA, 2018).

Avaliando-se os efeitos maléficos da queima da cana, o governo do Estado de São Paulo tem adotado medidas para evitar os danos ao meio ambiente e na saúde da população. Uma das medidas foi a criação da Lei nº 11.241/2002 que determina que a queima da cana não deve ser mais realizada como método de facilitador do corte da cana. Isto demonstrou uma diminuição do agravamento das doenças respiratórias da população que reside próximo a canaviais (NICOLELLA; BELLUZZO, 2015).

1.4.2 Fibras da cana e doenças

Um estudo envolvendo DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) tratada com medicamentos e o uso de fibras totais da cana, paralelamente, demonstrou que houve melhora significativa na inflamação e sintomas da DPOC, devolvendo uma melhor qualidade de vida dos pacientes (MIAO, 2016).

A fibra da cana já demonstrou potencial na perda de peso. Segundo uma pesquisa realizada pelo *Pennington Biomedical Research Center* (2014), que envolvia humanos obesos e resistentes a insulina que ingeriram fibras totais presente no bagaço da cana, celulose e pouca fibra (cerca de 4g por dia), em uma espécie de biscoito e de bolo, quando comparados, os pacientes que se alimentaram de biscoitos e bolos suplementados com a fibra da cana, obtiveram um menor ganho de peso e a diminuição de níveis de açúcar e insulina no sangue em jejum. As hipóteses encontradas foram de que, ao se comparar o consumo de fibra da cana com o consumo de celulose, por exemplo, houve um aumento a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. Os pacientes não ganharam peso, pois o consumo de fibra da cana aumenta os hormônios intestinais relacionados à saciedade (BOTANICAL, 2014).

Sabendo da importância das fibras dietéticas na modulação da microbiota intestinal e no sistema imunológico, e da necessidade de se aproveitar alimentos que estão sendo desperdiçados, a hipótese desse trabalho é que as fibras dietéticas existentes no bagaço da cana-de-açúcar, poderiam ser utilizadas como moduladores do sistema imunológico e da asma alérgica experimental.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a importância das fibras dietéticas de cana de açúcar na inflamação alérgica das vias aéreas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o peso dos animais e consumo de ração;
- Analisar o influxo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar e parênquima pulmonar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Balb/C, machos adultos, na idade de 6 semanas, provenientes da Universidade Federal de São Paulo. Esse trabalho foi submetido e aprovado ao protocolo de Ética Animal da Universidade Federal de São Paulo, segundo o número 6976240816 (Apêndice A).

Os animais foram distribuídos em dois grupos: não sensibilizado e experimentalmente alérgico. Dentro destes dois grupos, os animais foram separados segundo o tratamento (n=5): ração controle sem asma, ração rica em fibra sem asma, ração controle com asma e ração rica em fibra com asma. Os camundongos foram alimentados por duas semanas antes do início da indução da asma alérgica experimental. O protocolo para indução da asma alérgica experimental que foi utilizado, consistem de duas sensibilizações e três desafios com ovalbumina (todos via intra-traqueal). Após vinte e quatro horas do último desafio, os animais serão eutanasiados e o lavado broncoalveolar e tecido foram coletados para as análises da inflamação e estudos dos possíveis mecanismos envolvidos nos resultados obtidos.

3.2. Administração da dieta rica em fibras da cana de açúcar

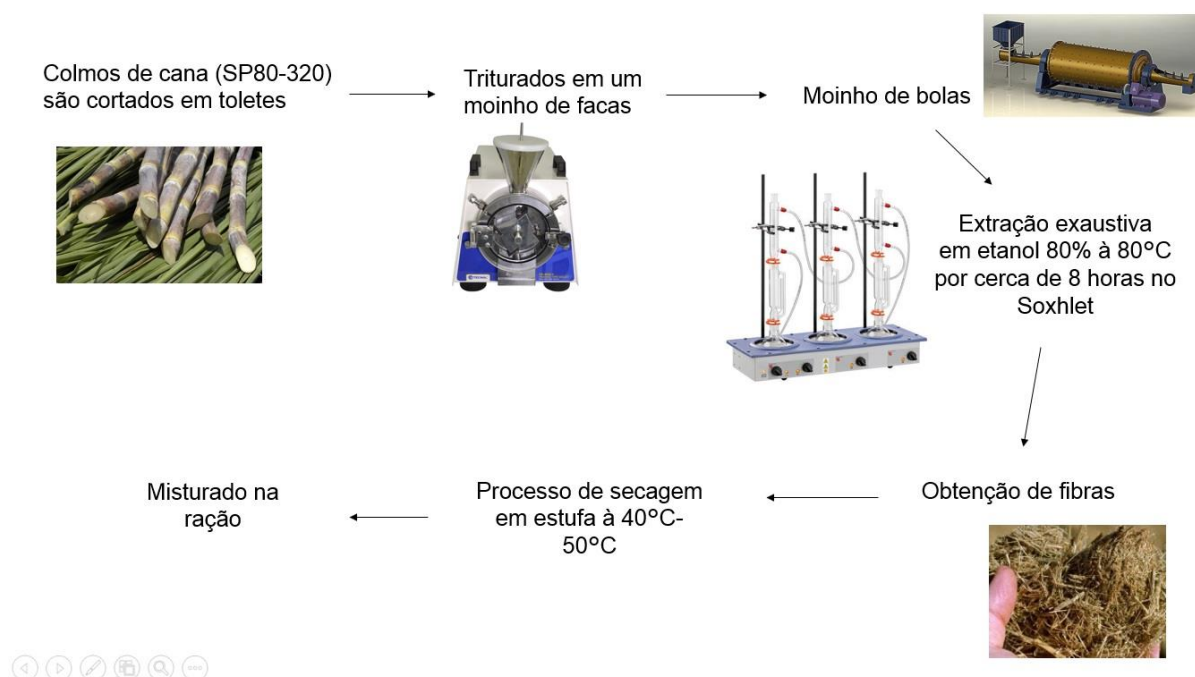
Os animais foram alimentados com a ração AIN93M modificada com 6% de fibras totais do bagaço da cana-de açúcar a dieta padrão foi padronizada por Reeves

et al. (1993) (Apêndice 2). Retirou-se da ração padrão 6% de amido de milho presente na receita, e substituímos por fibras da cana-de açúcar. Misturava-se todos os ingredientes (inclusive a fibra) em um recipiente adequado e separado somente para a fabricação de ração. Para sabermos qual seria o ponto correto para fazermos os pellets, utilizávamos a água, até que a massa apresentasse determinada consistência. Finalizada a ração, a mesma era armazenada em freezer -20°C.

3.3. Extração das fibras do bagaço da cana de açúcar

As fibras utilizadas neste trabalho foram extraídas e cedidas pela Professora Doutora Aline Cavalari (Figura).

Figura 8: método utilizado para extração de fibras do bagaço da cana de açúcar fibra da cana.



Fonte: Colmos de cana. Disponível em: <<http://www.sifaeg.com.br/xtimeline/inovacao-plantio-da-cana-de-acucar/>>. Acesso em: 24/10/18 (editada)

Moinho de facas. Disponível em: <<http://tecnal.com.br/produtos/moinho-de-facas-tipo-wiley-te-650-1-tecnal/>>. Acesso em: 24/10/18

Moinho de bolas. Disponível em: <https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1023663035-projeto-de-moinho-de-bolas-para-moagem-e-misturas-_JM>. Acesso em: 24/10/18

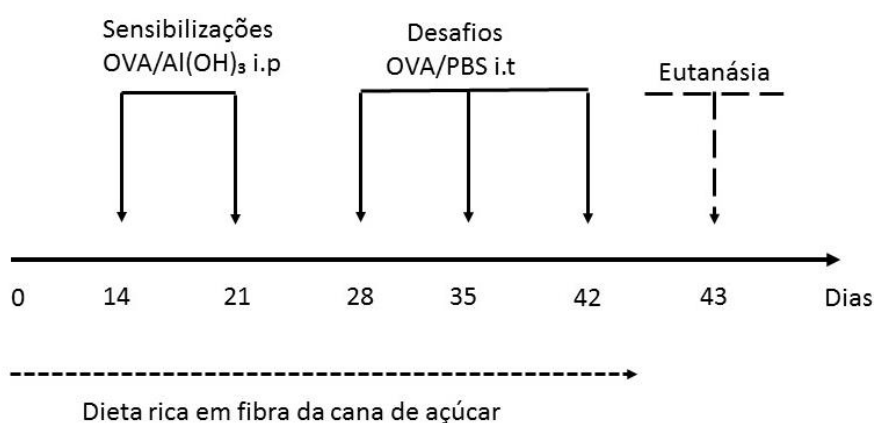
Fibras do bagaço da cana. Disponível em: <<https://www.cpt.com.br/noticias/pesquisadores-produzem-fibra-de-carbono-com-bagaco-de-cana>>. Acesso em: 24/10/18

Soxhet. Disponível em: < <https://www.indiamart.com/proddetail/soxhlet-extraction-unit-5652146430.html>>. Acesso em: 21/11/2018

3.4. Modelo de asma experimental

Animais foram imunizados intra peritonealmente (i.t) inicialmente com 50 µg de ovalbumina (OVA) e 1.6 mg em 200 µL de hidróxido de alumínio em gel nos dias 0 e 7. Após as duas imunizações os animais foram desafiados nos dias 28, 35 e 42 com 50 µg de OVA em 40 µL de PBS1x estéril. Todos os desafios foram realizados via intratraqueal.

Figura 9: Protocolo experimental. Os camundongos foram alimentados inicialmente com a fibra do bagaço da cana de açúcar e posteriormente sensibilizados e desafiados com ovalbumina e PBS.



Fonte: Próprio autor

3.5. Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado aplicando 0,8 mL de PBS gelado dentro da traqueia e aspirando de volta para a seringa. O lavado foi repetido duas vezes, totalizando um volume de aproximadamente 1,6 mL. Após a coleta do LBA, o mesmo foi centrifugado e o sobrenadante foi estocado a - 80°C. Com o auxílio do Cytospin (citocentrífuga), foi possível a confecção de lâminas para posterior análise morfológica das células presentes no lavado broncoalveolar. A coloração foi realizada com Hematoxilina-Eosina (H&E). Com o microscópio, realizou-se a análise diferencial das células do lavado broncoalveolar.

3.6. Peroxidase eosinofílica

A avaliação da presença de infiltrado eosinofílico foi feito pela quantificação de peroxidase eosinofílica no tecido. Resumidamente 100mg de tecido foi homogeneizado em 1,9 ml de tampão fosfato (PBS) de concentração de 5 vezes e centrifugado por 10 minutos a 12.000 x. O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos lisados. As amostras foram então centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 1,9 ml de brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% em PBS, congelado três vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 4 ° C a 12.000 x por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático pela adição de uma quantidade igual de substrato (1,5 mmol / L de o-fenilenodiamina e 6,6 mmol / L de H₂O₂ em 0,075 mmol / L de Tris-HCl (pH 8)). A reação foi interrompida com 50 µl de H₂SO₄ 1 M e a absorbância foi lida a 492 nm(VIEIRA et al., 2009).

3.7. Mieloperoxidase neutrofílica

A avaliação da presença de neutrófilos no tecido pulmonar foi quantificado através da atividade de mieloperoxidase (MPO). Resumidamente, as amostras de tecido congeladas foram descongeladas e suspensas em tampão fosfato a 10% (pH 6,0) contendo 1% de brometo de hexadeciltrimetilamônio. As amostras foram centrifugadas à 12000 rpm durante 15 min à 4° C. Uma alíquota (30 µl) foi transferida para 180 µl de tampão fosfato (pH 6,0) contendo 0,167 mg / mL de dicloridrato de o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A absorbância foi lida a 490 nm. Os resultados são expressos como unidades de atividade de MPO por grama de tecido pulmonar (TAI et al., 2017 modificado)

3.8. Análise estatística

Os gráficos e análise estatística foram realizadas usando Prism Software (version 4.00; GraphPad). Os experimentos foram analisados por 1-way ANOVA ou teste t de Student não pareado.

4. RESULTADOS

4.1. Análise do bem estar animal

Durante o período de experimentação, prezamos pela qualidade de vida e bem estar dos animais durante os procedimentos realizados. Logo, avaliamos se o excesso da ingestão de fibras poderia ter causado disenteria ou algum tipo de desconforto aos animais. Porém, os animais que ingeriram fibra, não apresentaram nenhum sintoma relacionado a disenteria, dor, fezes sanguinolentas, indisposição ou perda de peso. Mostrando que não houveram alterações em seu bem estar.

Os critérios utilizados para avaliação de dor nos animais foi baseado no curso de extensão da Universidade de São Paulo (USP) - Uso de Animais para Experimentação. Segundo este curso, pode-se avaliar a dor em animais, segundo:

- Seu comportamento com os outros animais (agressividade ou isolamento);
- Pêlos ouriçados;
- Posição encurvada.

Estes critérios foram avaliados durante todo o período de experimentação.

Tabela 1 – Análise do bem estar animal durante o período de experimentação. Animais de ambos os grupos apresentaram boas condições e qualidade de vida.

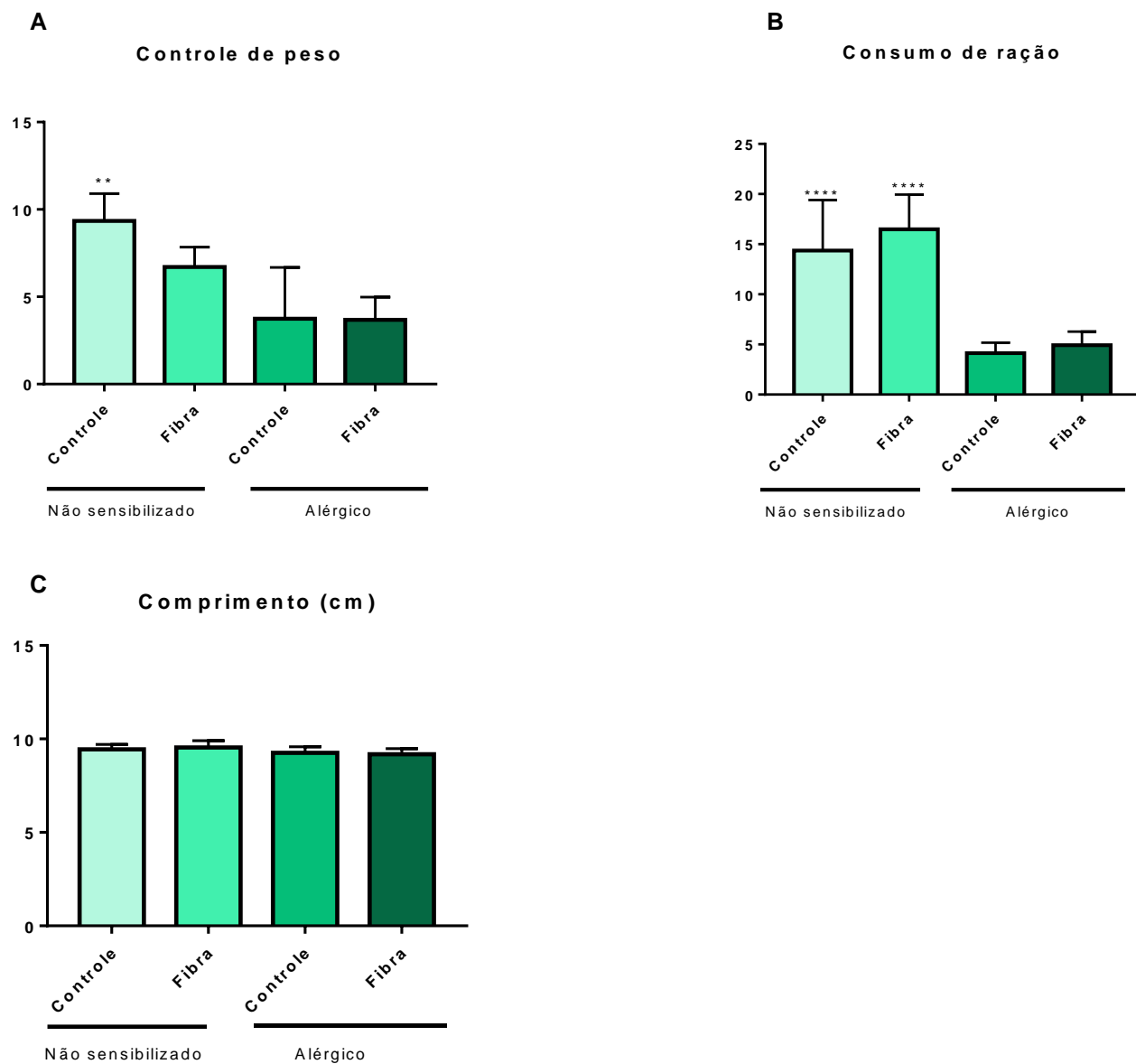
GRUPO	DISENTERIA	MELENA	DOR
FIBRA	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou
CONTROLE	Não apresentou	Não apresentou	Não apresentou

Fonte: Próprio autor

4. 2. Análise do consumo de ração e ganho de peso

No controle de peso (figura 10A), é possível observar que os animais do grupo controle não sensibilizados, apresentaram maior ganho de peso quando comparado aos grupos alérgicos. O consumo de ração (figura 10B) apresentou diferença estatística, quando comparado com os grupos não sensibilizado e o alérgico. O grupo alérgico não apresentou diferença de consumo entre si. Pode-se observar na figura 10C, que os animais não apresentaram diferenças no comprimento.

Figura 10 – Análise de peso, consumo de ração e comprimento. (A) Evolução do peso corpóreo (B) Consumo de ração por animal por dia. (C) Comprimento nasoanal. ANOVA 1- via, ** = $p < 0,0023$ vs. Controle não sensibilizado e Fibra alérgico. . As barras representam média \pm epm.



Fonte: Próprio autor

4. 3. Análise de inflamação pulmonar

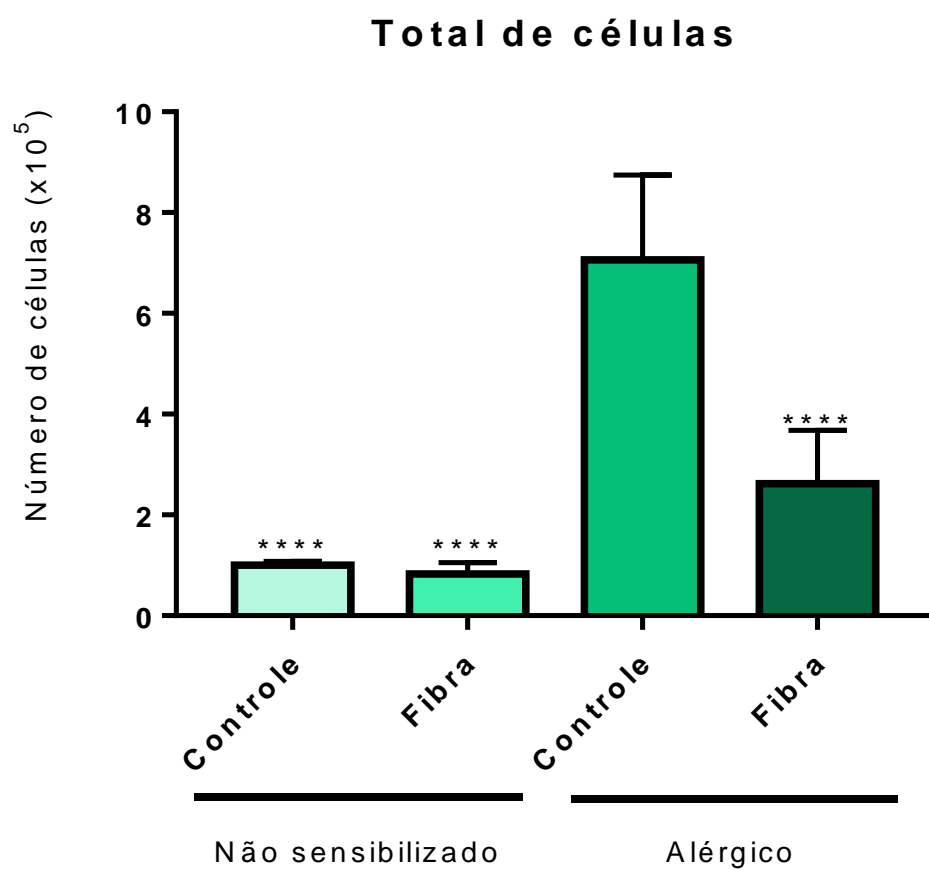
Através da contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar, é possível observar que houve um aumento no infiltrado inflamatório de animais alérgicos (figura 11) , podendo-se observar diferença estatística entre os grupos alérgicos.

Na porcentagem da contagem diferencial de células (figura 12), observa-se que o grupo alérgico tratado com a fibra do bagaço da cana de açúcar, apresentou diminuição no número de eosinófilos, neutrófilos e mononucleares. O mesmo é observado na contagem diferencial de células (figura 13), mostrando assim, que a utilização da fibra como prebiótico, possui a capacidade de diminuir a inflamação das vias aéreas.

Os animais não sensibilizados a OVA, não apresentaram aumento no número total de células, na contagem diferencial de eosinófilos e neutrófilos. Mas apresentaram cerca de 99% de células mononucleares.

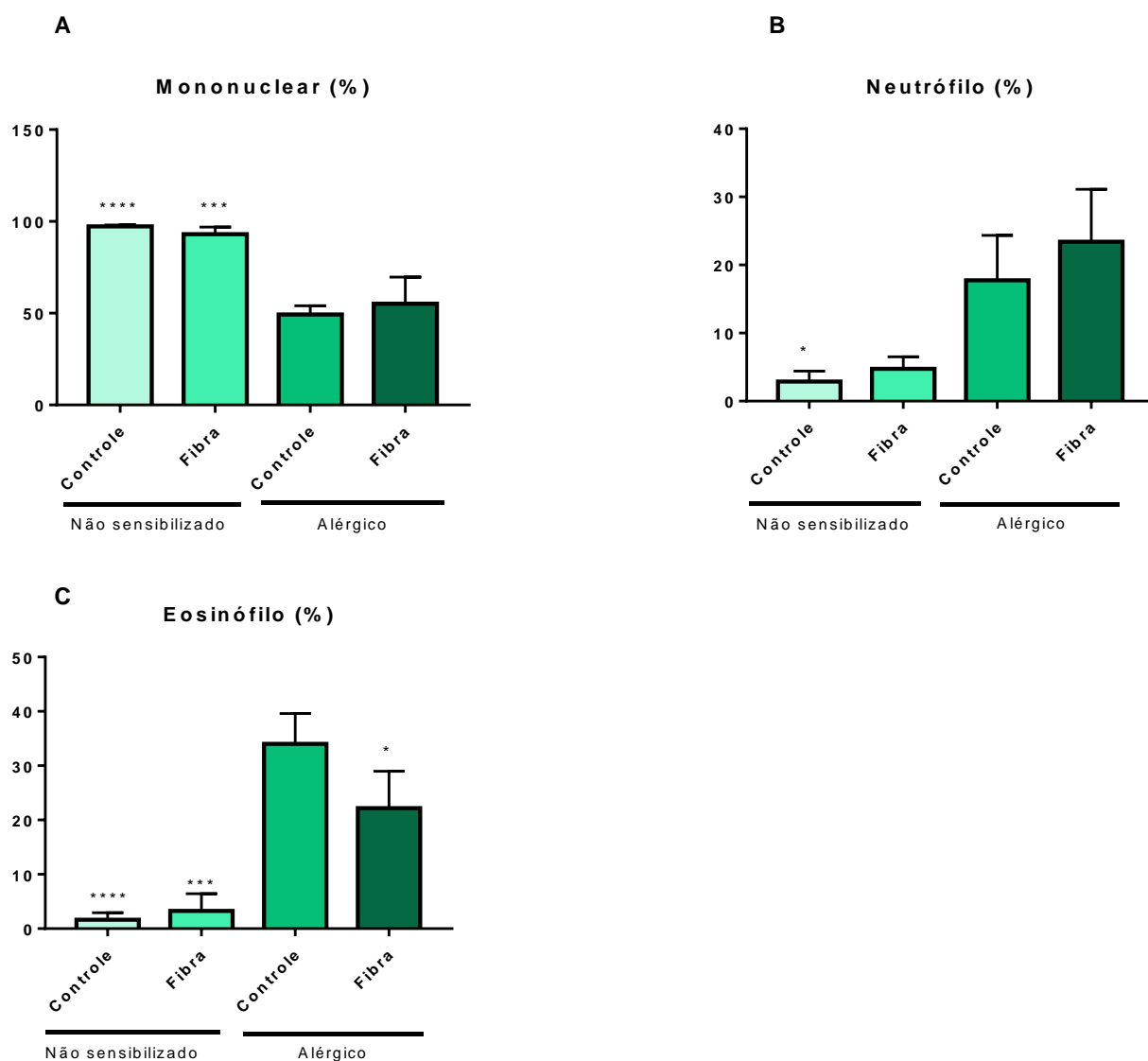
Figura 11 – A administração de fibras de cana de açúcar, reduz o número total de células encontradas no lavado broncoalveolar (LBA) apresenta diminuição no grupo Fibra alérgico.

ANOVA-1 via, **** = $p < 0,0001$ vs. Controle alérgico para Fibra alérgico e grupos não sensibilizados. As barras representam média \pm epm



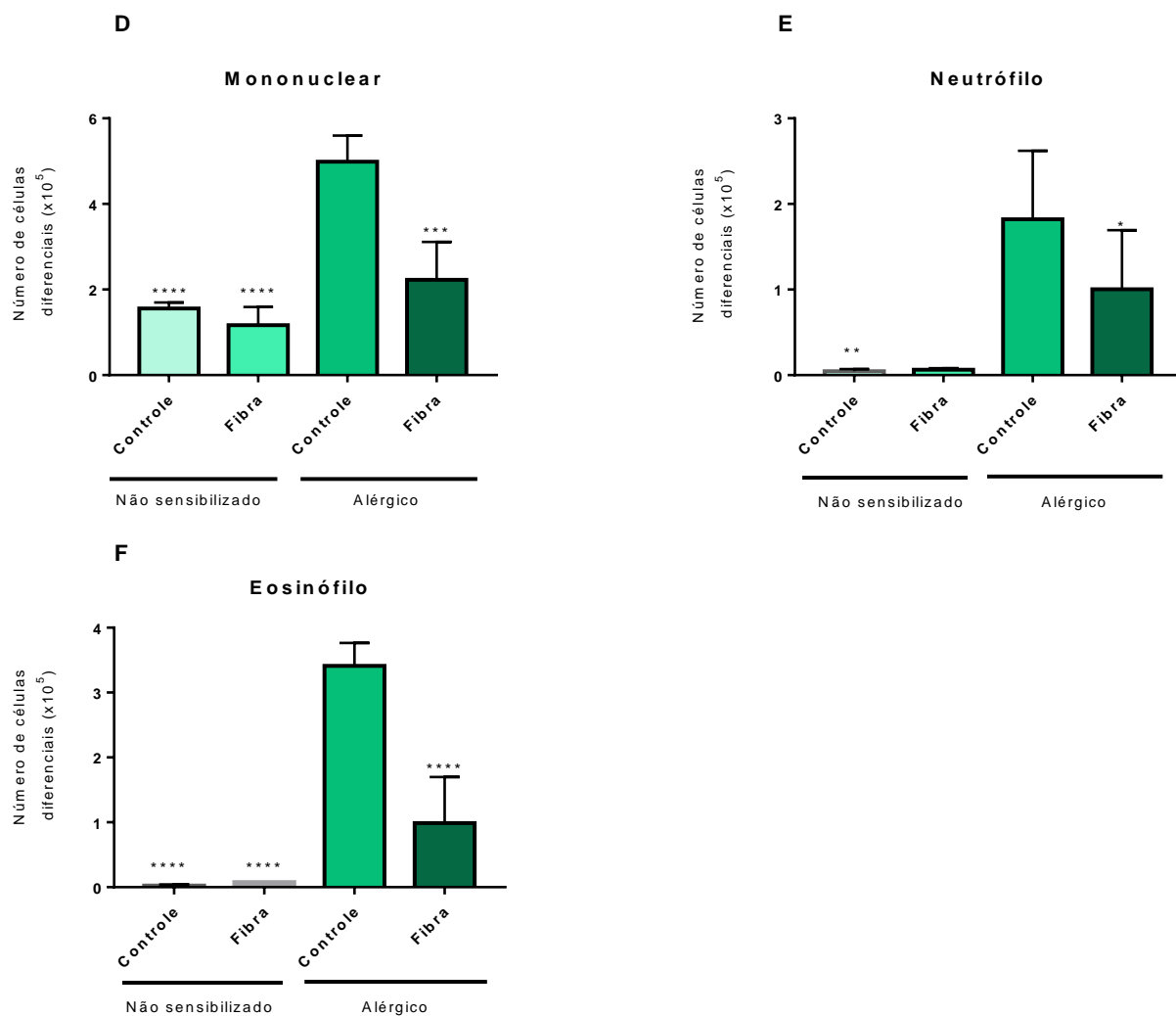
Fonte: Próprio autor.

Figura 12 – A administração de fibras da cana de açúcar, reduz a percentagem de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) de animais experimentalmente alérgicos. ANOVA -1 via, * = $p < 0,0255$, ** = $p < 0,0014$, *** = $p < 0,0005$, **** = $p < 0,0001$ vs. Controle alérgico. As barras representam média \pm epm.



Fonte: Próprio autor

Figura 13 – A administração de fibras da cana de açúcar, diminui o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar de animais experimentalmente alérgicos. ANOVA-1 via $*=p <0,01$, $***=p <0,001$, $****=p <0,0001$ vs. Controle alérgico. As barras representam média \pm epm.



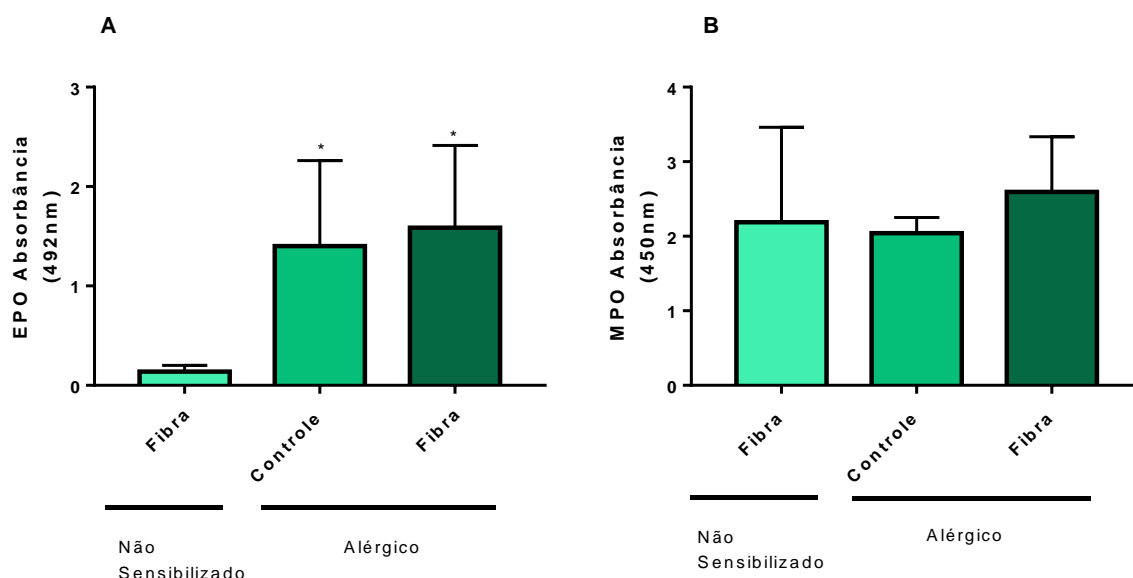
Fonte: Próprio autor

4.4. Análise de peroxidase eosinofílica e mieloperoxidase neutrofílica

A partir da análise realizada para se detectar a presença de eosinófilos e neutrófilos no parênquima pulmonar dos animais, avaliou-se as enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase neutrofílica (MPO) no pulmão. É possível observar uma alta presença de peroxidase eosinofílica, quando se compara os grupos alérgicos com o não sensibilizado. Porém, entre os grupos alérgicos e o não sensibilizado, não foi possível observar diferença estatística para a presença de mieloperoxidase neutrofílica.

Com a alta taxa destas enzimas, pode-se concluir que houve uma grande presença de eosinófilos e neutrófilos no tecido, o que caracteriza a presença de alergia.

Figura 14 – A administração de dieta rica em fibra da cana, não alterou os níveis das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase neutrofílica (MPO) no pulmão. Não houve diferença estatística no MPO. ANOVA-1 via $*=p < 0,0156$ vs. Grupos não sensibilizado.



Fonte: Próprio autor

5. DISCUSSÃO

As fibras dietéticas apresentam papel importante para manutenção da saúde. Elas podem ser oriundas de vários alimentos e um dos alimentos pouco explorados quanto a importância das fibras para a saúde, é a cana de açúcar. Nosso trabalho demonstrou que camundongos experimentalmente alérgicos que se alimentaram de ração rica em fibra, apresentaram redução do infiltrado inflamatório nas vias aéreas quando comparados com animais experimentalmente alérgicos que se alimentaram de ração controle.

As fibras dietéticas estimulam a proliferação de diferentes bactérias, mas os mecanismos envolvidos sobre como estas bactérias podem acabar auxiliando na resposta a inflamações não foram bem elucidados. Atarashi et al. e Tang et al., demonstraram que estas bactérias além de serem capazes de modular respostas, podem diminuir as respostas que antes eram exacerbadas, através de componentes da parede celular e de seus metabólitos (SOKOLOWSKA, 2018). Os metabólitos que demonstraram eficácia nesta modulação incluem peptídeos antimicrobianos, competição com bactérias patogênicas e estimulação do desenvolvimento e diferenciação de células imunes (McALLER;KOLLS, 2017).

Porém, os principais metabólitos que através do uso de prébióticos apresentou significativo efeito imunorregulador foram os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o acetato, propionato e butirato. Estes AGCC são produzidos pela microbiota e demonstraram influenciar as respostas de células dendríticas e células T (SMOLINSKA, GROEGER, O'MAHONY, 2017).

Embora não avaliado nesse estudo, é possível que a ingestão de fibras da cana altere a composição da microbiota intestinal. Sendo assim, os animais que se alimentaram de ração rica em fibra favoreceram grupos de bactérias benéficas e, conseqüentemente, criaram mecanismos protetores contra a asma alérgica experimental. A composição de fibras utilizadas neste estudo envolve celulose, hemicelulose e pectina.

A celulose e muitas das hemiceluloses fazem parte do grupo de fibras insolúveis, por tanto, acabam por ser pouco fermentadas pelas bactérias intestinais, aumentando assim a taxa de trânsito intestinal (HOLSCHER, 2017). O mecanismo pelo qual os AGCC conseguem estimular as células imunológicas é via receptores

GPR41, GPR43 e GPR103 presentes nessas células, levando ao desenvolvimento de uma resposta imunoregulatória pelo hospedeiro(FOLKERTS et al., 2018).

Zhang et al., (2016), notou que a composição da microbiota intestinal nos animais que foram tratados com celulose apresentaram proporção aumentada de bactérias do filo Bacterioidetes e Actinobacteria enquanto que o filo Firmicutes e Proteobacteria foram reduzidas quando comparados a composição da microbiota dos animais alérgicos não tratados. Sabe-se que estas mudanças estão correlacionadas com o desenvolvimento de doenças alérgicas, uma vez que Bacterioidetes são as bactérias que mais produzem AGCC(YU et al., 2015). Porém, não se sabe os mecanismos corretos sobre como a celulose consegue trazer esta melhora nos sintomas alérgicos uma vez que é uma fibra pouco fermentada, logo, não produz ácidos graxos de cadeia curta em grande proporção (ZHANG et al., 2016).

Por ser uma fibra solúvel, a pectina provoca o aumento da produção de AGCC por estas bactérias. E assim como com a celulose, Zhang et al., (2016) também estudou o uso da pectina para doenças alérgicas das vias aéreas. Animais que ingeriram ração suplementada com a pectina foram capazes de suprimir significativamente os sintomas alérgicos. Assim como também foram capazes de diminuir drasticamente o infiltrado inflamatório, principalmente, a presença de eosinófilos (ZHANG et al., 2016).

Como os camundongos da linhagem Balb/c possuem um perfil de inflamação Th2 (LEE et al., 2004), espera-se que os animais tenham produzido as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e tenham produzido anticorpos IgE. Neste trabalho não foi possível realizar a dosagem destas citocinas, necessitando a realização deste experimento para análise do potencial da fibra da cana em diminuir a presença das mesmas. Porém, nossa hipótese era de que houve a diminuição da presença destas citocinas, pois a fibra da cana contém pectina, e como anteriormente citado, a pectina possui o potencial de diminuir a inflamação Th2, pois é uma fibra facilmente fermentada pela microbiota intestinal e que leva a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Há estudos que demonstraram que estes ácidos graxos de cadeia curta interagem com as células imunes, tendo a capacidade de suprimir ou estimular suas ações.

Nesse trabalho, não avaliou-se os Ácidos Graxos de Cadeia Curta, porém é possível que esteja aumentado, já que na fibra administrada aos animais há pectina,

e a pectina quando metabolizada por bactérias intestinais, produz AGCC (ZHANG et al., 2016).

O resultado esperado para a análise da peroxidase eosinofílica e mieloperoxidase neutrofílica neste trabalho, era de que assim como na contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar, haveria a diminuição da presença destas enzimas, o que caracterizaria a diminuição de eosinófilos e neutrófilos no parênquima pulmonar. Porém, obtivemos o contrário e não havendo encontrado algo semelhante na literatura, seria importante uma melhor elucidação do motivo pelo qual isto pode ter ocorrido, através da repetição do experimento, aumentando assim, o número de animais.

Através da análise histológica é possível observar a presença do infiltrado inflamatório e do muco presente nos pulmões. Zhang et al., (2016) notou que em animais que se alimentaram com fibras (como pectina e celulose), houve supressão significativa do infiltrado inflamatório e diminuição da produção de muco nos pulmões quando comparados com os grupos que ingeriram fibra padrão e grupos que se alimentaram com pouca fibra. Apesar de não ter sido possível a realização desta análise neste trabalho, precisa-se ser melhor investigado.

A asma também possui como característica a hiperreatividade frente a exposição a algum alérgeno através do mecanismo de mediadores de broncoconstrição que são liberados por células inflamatórias (NEUPARTH, 2018). Também não foi possível realizar esta análise neste trabalho, sendo necessário realizar a análise para poder quantificar a hiperreatividade presente nos animais.

A dieta rica em fibras iniciou-se aproximadamente 2 semanas antes da primeira sensibilização com ovalbumina (OVA) e foi mantida mesmo após entrarem no quadro alérgico, pois estes animais continuaram consumindo estas fibras. Portanto, se trata de um tratamento preventivo, seria interessante investigar se dieta rica em fibra administrada após a sensibilização também apresentaria o mesmo efeito ou efeito semelhante.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos dados encontrados e na análise de literatura, conclui-se então que as fibras presentes no bagaço da cana de açúcar, possuem potencial de diminuir a inflamação alérgica experimental das vias aéreas. Com isto, estudos semelhantes a estes podem ser elaborados com o objetivo de trazer uma nova perspectiva sob este subproduto brasileiro, podendo ser reaproveitado pela indústria alimentícia no Brasil.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv.. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Defining dietary fiber**. Disponível em: <<https://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Pages/DietaryFiber.aspx>>. Acesso em: 21/11/18

ABRAHAMSSON, T.R. et al. **Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age**. Clin Exp Allergy, 2014. V. 44. 842 p.

BERNAUD, Fernanda Sarmiento Rolla; RODRIGUES, Ticiania da Costa. **Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo**. Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia, 2013. V. 57. 397 p.

BIASUCCI, Giacomo. et al. **Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut**. Early Hum Dev, 2010 . V. 86. 13 p.

BBC – **Por que há uma explosão de obesidade no Brasil?** Disponível em: <<https://g1.globo.com/bemestar/noticia/por-que-ha-uma-explosao-de-obesidade-no-brasil.ghtml>> Acesso em: 10/09/18

BOTANICAL. **Botanical Dietary Supplements Research Center**. Disponível em: <<http://botanical.pbrc.edu/pdf/Hsia%20Botanical%20Symposium%202014.pdf>> . Acesso em: 16/09/2018

BOTTCHER, M. E. et al. **Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants**. Clin Exp Allergy, 2000. V. 30. 1591 p.

CARDOSO, Thiago de Araujo. et al. **The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2017. V. 43. 163 p.

CRIMI, Emanuele. et al. **Allergic inflammation and airway smooth muscle function.** Sci Total Environ, 2001. v. 270. 57 p.

DATASUS. **Departamento de Informática do SUS** - Disponível em: < <http://datasus.saude.gov.br/>> . Acesso em: 29/09/18

DAVID, Lawrence A. et al. **Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome.** Nature, 2014. V. 505. 559 p.

DE FILIPPO, Carlotta. et al. **Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa.** Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. V. 107. 14691 p.

DE VADDER, Filipe. et al. **Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits.** Cell, 2014. V. 156. 84 p.

DICIONÁRIO ONLINE DE PORTUGUÊS – Disponível em:
< <https://www.dicio.com.br/cana-de-acucar/>> Acesso em: 09/11/18

DOMINGUEZ-BELLO, Maria G. et al. **Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns.** Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. V. 107. 11971 p.

DUNCAN, Sylvia H. et al. **Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces.** Appl Environ Microbiol, 2007. V. 73. 1073 p.

EL AIDY, Sahar. et al. **The gut microbiota and mucosal homeostasis: colonized at birth or at adulthood, does it matter?**. Gut Microbes, 2013. V. 118 p.

FAO/WHO. **Joint Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**, 1-4 October 2001

FANARO, Silvia. et al. **Intestinal microflora in early infancy: composition and development**. Acta Paediatr Suppl, 2003. V. 93. 48 p.

FELLOWS, Rachel. et al. **Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases**. Nature communications, 2018. v. 9. n. 1. 105 p.

FERNANDEZ, Leónides. et al. **The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease**. Pharmacol Res, 2013. V. 69. 1 p.

FERREIRA, Caroline Marcantonio. et al. **The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases**. Journal of immunology research, 2014. v. 2014

FERREIRA, Savio Siqueira. et al. **Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane**. Plant Mol Biol, 2016. V. 91. 15 p.

FOLKERTS, Jelle et al. **Effect of Dietary Fiber and Metabolites on Mast Cell Activation and Mast Cell-Associated Diseases**. Frontiers in immunology, 2018. V. 9.

GIGANTE, Giovanni. et al. **Role of gut microbiota in food tolerance and allergies**. Dig Dis, 2011. V. 29. 540 p.

GOUVEIA, Ester Ribeiro. et al. **Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar**. Quim Nova, 2009. v. 32. n. 6. 1500 p.

GOVERNO DO BRASIL – Asma atinge 6,4 milhões de brasileiros. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2015/01/asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>> Acesso: 29/09/18

HERBST, Tina. Et al. **Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization.** Am J Respir Crit Care Med, 2011. V.184. 198 p.

HOLSCHER, Hannah D. **Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota.** Gut Microbes, 2017. V. 8. 172 p.

KARP, Marsha w; SANTELIZ, Joanna; KARP, Christopher L. **The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis.** Nat Rev Immunol, 2001. V.1. 69 p.

KRAJMALNIK-BROWN, Rosa. et al. **Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation.** Nutrition in Clinical Practice, 2012. V. 27. 201 p.

MASOLI, Matthew. et al. **The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report.** Allergy, 2004. v. 59. 469 p.

MIAO, Liu. et al. **Sugarcane bagasse dietary fiber as an adjuvant therapy for stable chronic obstructive pulmonary disease: a four-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study.** Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016. V. 36. 418 p.

MUTIUS, Erika Von; VERCELLI Donata. **Farm living: effects on childhood asthma and allergy.** Nat Rev Immunol, 2010. 861 p.

NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE – **Asthma.** Disponível em: <<https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/asthma#Treatment>>. Acesso em: 22/11/18

NEUPARTH, Nuno – **Fisiopatologia da asma**. Disponível em: <<http://www.mypneumologia.pt/opini%C3%A3o/75-fisiopatologia-da-asma.html>> Acesso em: 11/11/18

NICOLELLA, Alexandre C; BELLUZZO, Walter. **The effect of reducing the pre-harvest burning of sugar cane on respiratory health in Brazil**. Environment and Development Economics, 2015. V. 20. 127 p.

NOVA CANA – **A produção da cana de açúcar no Brasil e no mundo**. Disponível em: < <https://www.novacana.com/cana/producao-cana-de-acucar-brasil-e-mundo/>> Acesso em:29/09/18

OBER, Carole **Asthma Genetics in the Post-GWAS Era**. Ann Am Thorac Soc, 2016. V. 13. S85 p.

OBER, Carole; VERCELLI, Donata. **Gene–environment interactions in human disease: nuisance or opportunity?**. Trends Genet, 2011. V. 27. 107 p.

ORTQVIST, Anne K. et al. **Antibiotics in fetal and early life and subsequent childhood asthma: nationwide population based study with sibling analysis**. BMJ, 2014. V.349. g6979 p.

PRADEEPAN, Shyamala; GARRISON, Garth; DIXON, Anne E. **Obesity in asthma: approaches to treatment**. Current allergy and asthma reports, 2013. V. 13. 434 p.

REEVES, Philip; NIELSEN, Forrest H; FAHEY JR, George C. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet**. J Nutr, 1993. 1939 p.

RIBEIRO, Helena. **Queimadas de cana-de-açúcar no Brasil: efeitos à saúde respiratória**. Revista de Saúde Pública, 2008. V. 42. 370 p.

RIBEIRO, Helena; ASSUNÇÃO, João Vicente de. **Efeitos das queimadas na saúde humana**. Estudos avançados, 2002. V. 16. 125 p.

RIGUERA, Denise; ANDRÉ, Paulo Afonso; ZANETTA, Dirce Maria Trevisan. **Poluição da queima de cana e sintomas respiratórios em escolares de Monte Aprazível, SP**. Revista de Saúde Pública, 2011. V. 45. 878 p.

RUSSELL, Shannon L. et al. **Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma**. EMBO Rep, 2012. V. 13. 440 p.

SANTOS, Fernando A. et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. Química Nova, 2012. v. 35. n. 5. 1004 p.

SARGAUTIENE, Vanda; NAKURTE, Ilva; NIKOLAJEVA, Vizma. **Broad Prebiotic Potential of Non-starch Polysaccharides from Oats (Avena sativa L.): an in vitro Study**. Polish Journal of Microbiology, 2018. v. 67 , ISSUE 3

SERGOMEL – **Bagaço da cana de açúcar: como pode ser utilizado?** Disponível em:<<https://www.sergomel.com.br/conteudo/bagaco-da-cana-de-acucar-como-pode-ser-utilizado.html>>. Acesso em: 24/10/18

SOKOLOWSKA, Milena. et al. **Microbiome and asthma**. Asthma research and practice, 2018. V.4. 1 p.

TAI, Wenlin et al. **Fibrocytes Ameliorate Acute Lung Injury by Decreasing Inflammatory Cytokine and Chemokine Levels and Reducing Neutrophil Accumulation in the Lung**. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. V. 44. 1526 p.

TROMPETTE, Aurélien. et al. **Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis**. Nat Med, 2014. V. 20. 159 p.

VERCELLI, Donato. **Gene-Environment Interactions in Asthma and Allergy: The End of the Beginning?**. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2010. 145 p.

VIEIRA, Angélica T. et al. **Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis.** The American journal of pathology, 2009. V. 175. 2382 p.

VIEIRA, Angélica Thomaz; FUKUMORI, Claudio; FERREIRA, Caroline Marcantonio. **New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases.** Clinical & translational immunology, 2016. v. 5. n. 6. e87 p.

WANG, Zhong Q. et al. **Effects of dietary fibers on weight gain, carbohydrate metabolism, and gastric ghrelin gene expression in mice fed a high-fat diet.** Metabolism, 2007. V. 56. 1635 p.

WOLF, Kyle J; LORENZ, Robin G. **Gut Microbiota and Obesity.** Curr Obes Rep, 2012. V. 1.1 p.

YU W. et al. **Reduced airway microbiota diversity is associated with elevated allergic respiratory inflammation.** Ann Allergy Asthma Immunol, 2015. V 115: 63–68

ZHANG, Zhiyu. et al. **Dietary fiber intake regulates instestinal microflora and inhibits ovalvumin-induced allergic airway inflammation in a mouse model.** Plos one, 2016. V. 11. E0147778 p.

APÊNDICE A – Certificado de aprovação de projeto



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel das fibras dietéticas provenientes da cana de açúcar na inflamação alérgica experimental das vias aéreas", protocolada sob o CEUA nº 6976240816 (ID 004981), sob a responsabilidade de **Caroline Marcantonio Ferreira e equipe; Andressa Rodrigues de Freitas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 04/11/2016.

We certify that the proposal "", utilizing 80 Isogenics mice (80 males), protocol number CEUA 6976240816 (ID 004981), under the responsibility of **Caroline Marcantonio Ferreira and team; Andressa Rodrigues de Freitas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 11/04/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [Novembr](#) a [Agosto](#)/ Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 6 semanas](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Origem: [Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 6 semanas](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento:

São Paulo, 24 de novembro de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

APÊNDICE B – Receita da ração AIN93M

**Dieta Rica em fibra 15% modificada do laboratório de aterosclerose e Bioquímica
Nutricional Labin – ICB - UFMG**

DIETA AIN-93M – Animais com idade SUPERIOR a 6 semanas

Versão: 1	Data: q/05/09	Páginas: 2
Materiais e equipamentos		Quantidade
BHT		0,008 g
Bitartarato de colina		2,50 g
Cistina (metionina)	← 541g	1,80 g
Mix de vitaminas	← 8	10,00 g
Mix de minerais	← 8	35,00 g
Celulose	← 8 - 50,00g	50,00 g
Óleo de soja	* Supermercado – uso LIZA	40,00 g
Sacarose	* Supermercado- açúcar crystal	100,00 g
Maltodextrina	← 8	155,00 g
Caseína	← 8	140,00 g
Amido de milho	* Supermercado maisena	465,692 g
Água destilada (para formar os pellets)		300,00 g
Bacia		2
Balança comum (pesa até 3,0 Kg)		-
Balança analítica		-
Barquinha		2
Bêquer		1
Espátula		2
Peneira pequena		1
Pote com tampa para armazenamento de dieta		2

Procedimentos

Pó:

- 1) Misturar os ingredientes sólidos na bacia (exceto o mix de vitaminas), em ordem crescente;
- 2) Acrescentar à mistura anterior o mix de vitaminas (com a luz apagada, pois este é sensível à oxidação);
- 3) Acrescentar o óleo de soja e misturar bem;
- 4) Passar o pó na peneira por três vezes, para homogeneizar a dieta;
- 5) Armazenar em pote limpo, identificado, no freezer ao lado do biotério.

Pellets:

- 1) Os pellets devem ser feitos em pequenas quantidades (são mais susceptíveis à formação de mofo);
- 2) Acrescentar água ao pó (aos poucos), misturar bem e formar pellets de aproximadamente 20g. A quantidade de água pode variar, por isso, deve-se acrescentá-la aos poucos, até que os pellets fiquem firmes, mas não quebradiços.

Armazenar em pote limpo, identificado, no freezer ao lado do biotério.

Observações

- Procedimentos para o preparo de aproximadamente 1000 g de ração;
- A balança de precisão só deverá ser usada para pesar a cistina, o bitartarato de colina e BHT. O restante dos ingredientes deverá ser pesado na balança comum;
- Não esquecer de tarar as balanças, ao utilizá-las;
- Os materiais usados (bêquer, barquinhas, etc) devem ser lavados para remoção de resíduos, antes de serem colocados no detergente.